

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-509215

(43)公表日 平成8年(1996)10月1日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	
A 6 1 K 48/00		8314-4C	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 5/10		8314-4C	31/70	AAM
15/09	Z NA	7431-4C	35/30	
# A 6 1 K 31/70	AAM	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z NAA
35/30		9281-4B	5/00	B
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁)	

(21)出願番号	特願平6-523361
(86) (22)出願日	平成6年(1994)4月11日
(85)翻訳文提出日	平成7年(1995)10月12日
(86)国際出願番号	PCT/US94/03938
(87)国際公開番号	WO94/23754
(87)国際公開日	平成6年(1994)10月27日
(31)優先権主張番号	08/046, 527
(32)優先日	1993年4月13日
(33)優先権主張国	米国(US)
(81)指定国	E P (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人	アメリカ合衆国 アメリカ合衆国, メリーランド 20852, ロックビル, エグゼクティブ ブルバード 6011, ボックス 13, オーティーティー, ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス
(72)発明者	メージヤー, ユージーン オー. アメリカ合衆国, バージニア 22124, オークトン, エルムズミード コート 2919
(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 移植治療のための神経由来胎児セルラインの使用

(57)【要約】

ヒト胎児神経由来セルラインを宿主組織内に移植する。
本法は、さまざまな神経学的失調及び他の疾患の治療を可能にする。好ましいセルラインはSVGである。

【特許請求の範囲】

1. 不死化ヒト神経由来胎児セルラインの細胞を宿主内に移植することを特徴とする宿主の治療方法。
2. 胎児セルラインがヒト胎児星状細胞から誘導される、請求項1に記載の方法。
3. 細胞がSVGセルラインから誘導される、請求項2に記載の方法。
4. 細胞が、抗体に対して非透過性である膜によりカプセル化されている、請求項1に記載の方法。
5. 細胞が宿主の中枢神経系内に移植される、請求項1に記載の方法。
6. 細胞が宿主の脳幹神経節内に移植される、請求項5に記載の方法。
7. 細胞が宿主の腰椎膜内に移植される、請求項5に記載の方法。
8. 細胞が宿主の側室内に移植される、請求項5に記載の方法。
9. 細胞が神経外に移植される、請求項1に記載の方法。
10. 細胞が皮下に移植される、請求項9に記載の方法。
11. 細胞が、それらの細胞による発現のために、ペプチドをコードする核酸配列を含んで成るベクターによりトランسفェクトされている、請求項1に記載の方法。
12. ペプチドが酵素である、請求項11に記載の方法。
13. ペプチドが疾患関連抗原である、請求項11に記載の方法。
14. 移植後に細胞を除去することをさらに含んで成る、請求項13に記載の方法。
15. 細胞が、抗体に対して非透過性である膜によりカプセル化される、請求項13に記載の方法。
16. 宿主においてパーキンソン病を治療するための方法であって、SVGセルラインから誘導された細胞をその宿主の脳幹神経節内に移植することを特徴とする方法。
17. SVG細胞が、転写プロモーターと転写ターミネーターに作用可能な状態で結合されたチロシン水酸化酵素をコードする核酸配列によりトランسفェクトさ

れる、請求項16に記載の方法。

18. 宿主が、細胞の移植後に免疫抑制治療を必要としない、請求項16に記載の方法。

19. 宿主の中枢神経系における病変により引き起こされる神経学的疾患を治療する方法であって：

針をその中枢神経系内に入れ；そして

その針を通して細胞の懸濁液をその中枢神経系内に注射する、ここでこれらの細胞は不死化ヒト神経由来胎児セルライン由来である、

ことを特徴とする方法。

20. 病変が、中枢神経系の領域に制限され、そして細胞がその領域内に注射される、請求項19に記載の方法。

21. 細胞がSVG細胞である、請求項19に記載の方法。

22. 神経学的失調がパーキンソンズムである、請求項19に記載の方法。

23. 細胞が輸注ポンプにより注射される、請求項19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

移植治療のための神経由来胎児セルラインの使用

発明の背景

本発明は、一般的に、宿主内に遺伝的に無関係な細胞を移植することにより宿主を治療するための方法に関する。より特に、本発明は、不死化ヒト胎児神経由来細胞の移植により宿主を治療する方法を提供する。

臓器移植は、さまざまな疾患の治療の首尾よく、かつ、広く行われた手段になってきた。心臓、腎臓、そしてさらに肝臓移植は、多くの医療センターにおいてほとんど日常化している。不幸なことに、多くの臓器の失調は、全臓器移植による治療に従わない。例えば、中枢神経系の病変は、損傷組織を置換するための全臓器移植により治療されることができない。

全臓器移植治療による損傷組織の置換は、多くの疾患について、又はさらに、適当な疾患をもつ患者の全てについて不可能であるため、細胞移植の方法を開発するための試みがなされてきた。Sun et al., Biomat., Art.Cells, Art.Org., 15: 483-496 (1987)。生物学的に活性な化合物の欠陥をもたらす柔組織 (parenchymal) 病変は、その生物学的に活性な化合物を分泌する単離細胞又は細胞クラスターを移植することにより治療されることができる。例えば、糖尿病の動物は、ドナーの胰臓から分離されたランゲルハンス島の移植により首尾よく治療されてきた。Noel et al., Metabolism, 31: 184 (1982)。

細胞移植治療は、特に、神経学的疾患の治療を哀願している。固形組織移植は、いくつかの理由のために神経学的疾患のために特に

不適切である。固形組織移植のために必要とされるような、脳の開外科手術露出は、臨床的な神経学的欠陥をもたらす神経系経路に対する取返しのつかない損傷を引き起こすことができる。また、神経学的機能は、しばしば、外科学的に確立されることができない複雑な細胞間結合に依存する。さらに、中枢神経系の細胞は、無酸素症 (anoxia) 及び栄養欠乏 (nutrient deprivation) に鋭く感受性である。固形組織移植の速い血管新生 (vascularization) が不可欠である。なぜなら、固形移植の内部の細胞が生存力を維持するための十分な灌流をしばしば欠

くからである。

1つの一般的な神経学的症候群、パーキンソニズム (Parkinsonism) は、細胞移植治療における試みの目的である。Björklund et al., Brain Res., 177: 555-560 (1979); Lindvall et al., Science, 247: 574-577 (1990); Freed, Restor.Neurol.Neurosci., 3: 109-134 (1991)。パーキンソニズムは、脳幹神経節 (basal ganglia) の黒質 (substantia nigra) におけるドーパミン生産ニューロンの損失によって引き起こされる。Burns et al., N Engl.J.Med., 312: 1418-1421 (1985); Wolff et al., Neurobiology, 86: 9011-9014 (1989)。パーキンソン病、パーキンソニズムの臨床的顕出を特徴とする未知の病因の疾患は、これらのドーパミン生産ニューロンの特発性の破壊を引き起こされる。パーキンソニズムは、さまざまな薬物、例えば、抗精神病薬、又は化学剤、例えば、1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピロリジンにより引き起こされることができる。Burns et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80: 4546-4550 (1983) 及びBankiewicz et al., Life Sci., 39: 7-16 (1986)。

罹患した動物の線状体内にドーパミン作動性細胞を移植することにより実験的に誘発されたパーキンソニズムの臨床的顕出を反転さ

せる試みが行われている。(チロシン水酸化酵素をコードするDNAによりトランスフェクトされた) 遺伝子修飾された線維芽細胞が、ドーパミン作動性経路の病変をもつ動物内に首尾よく移植された。これらの動物の運動機能及び姿勢は、これらのドーパミン生産線維芽細胞の移植後に改善された。Wolff et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 86: 9011-9014 (1989); Fisher et al., Neuron, 6: 371-380 (1991)。出生後に得られた細胞に比べて、胎児組織の移植により、移植生存率は高められ、そしてそれ故臨床的改善が延長されることができる。Gage and Fisher, Neuron, 6: 1-12 (1991)。新鮮な胎児のドーパミン作用性ニューロンは、その黒質線状体のドーパミン系に対する化学的損傷の後にサルの尾状核 (caudate nucleus) 内に移植された。移植後、この損傷誘導姿勢欠陥が改善された。Bankiewicz et al., J.Neurosurg., 72: 231-244 (1990) 及びTaylor et al.

, Prog. Brain Res., 82: 543-559 (1990)。

パーキンソンズムを患うヒトは、ドーパミン作用性ニューロンの線状体移植により治療された。Lindvall et al., Arch. Neurol., 46: 615-631 (1989); Widner et al., New Engl. J. Med., 327: 1556-1563 (1992)。これらの移植細胞は、中絶 (abortion) から得られた。中絶に先立って、女性を、いくつかの疾患を引き起こすウイルスに対する抗体についてスクリーニングした。外科手術後、治療された患者は、神経学的機能の改善を示した。しかしながら、これらの患者は、維持免疫抑制治療を必要とした。

最近の研究は、中枢神経系の支持細胞（星状細胞及び稀突起神経膠細胞）から放出される向性因子が細胞培養におけるニューロンの生存に不可欠である。O'Malley et al., Exp. Neurol., 112: 40-48 (1991)。神経成長因子を発現するよう遺伝子変更された移植線維芽細胞は、アルツハイマー病において観察される基底前脳内での

アセチルコリン・ニューロンの消滅を引き起こす采-脳弓 (fimbria-fornix) に対する損傷後の基底前脳のコリン作用性ニューロンの生存を強化することが示された。Rosenberg et al., Science, 242: 1575-1577 (1988)。

神経学的失調のための細胞移植治療における先の企ては、有望な結果を提供してきたけれども、いくつかの重大な問題が残存している。細胞移植のための胎児組織の供給は、ひじょうに限られている。最大生存能力を強化するために、それらの胎児細胞は、移植に先立って新鮮に収穫されなければならない。これは、選択的な中絶とのその移植手順の協調を必要とする。さらに、胎児組織は、米国内においては広く入手することができない。また、細胞が得られる胎児の妊娠期間が移植片生存に影響を与える。Gage and Fisher, 前掲。一定の妊娠期間だけの胎児組織を得ることは、移植のための胎児細胞の入手可能性に追加の限定を加える。さらに、倫理的な考慮が、いくつかの潜在的な移植受容者を、新鮮な胎児細胞が移植されるときに上記手順を経験することをいやがらせる。

上記胎児組織は、新鮮な流産児から得られるので、感染汚染のかなりの危険が存在する。胎児組織を供給するであろう中絶を経験する女性はさまざまな感染に

ついてスクリーニングされるけれども、いくつかの感染、例えば、HIVは臨床的に検出されることができず、そしてこれ故に、このスクリーニング過程の間に同定されることができない。それ故、広く行われる場合、新鮮な胎児細胞の移植は、多くの感染続発症を引き起こす傾向がある。

不死化セルラインの使用は、入手可能性及び感染のこれらの困難性の多くを克服することができるであろう。しかしながら、たった1の不死化ヒト胎児神経由来セルラインが報告されている。Major et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA, 82: 1257-1262 (1985) 及び米国

特許第4,707,448号。さらに、それらの現実の性質により不死化されたセルラインは、インビボにおける移植後に腫瘍形成を引き起こす素因となる。それ故、不死化細胞の治療的脳内移植は、頭蓋内腫瘍を引き起こす高い危険を担持し、そしてさらに、良性組織をもつ腫瘍は、頭蓋冠 (calvarium) 内に存在するとき、僅かな予後を担持することができる。

遺伝的無関係な細胞の移植は、免疫学的な移植片拒絶及び頭蓋内炎症の危険性を伴う。Widner and Brundin, Brain Res.Rev., 13: 287-324 (1988)。遺伝的に無関係な細胞の全ての移植は、この危険を伴う。それ故、頭蓋内細胞移植により治療された患者は、移植された不死化細胞の非存在中でさえも感染及び悪性合併症の高いリスクを伴う長期間の維持免疫抑制を必要としている。

不死化細胞の移植だけが、これらの合併症の危険を増大させる。

本分野において緊急に必要とされるのは、不死化ヒト胎児神経由来細胞を治療的に移植する方法である。理想的には、これらの方法は、移植後に腫瘍形成をもたらさず又は重度の感染を顕出しないであろう。望ましくは、これらの方法は、感染汚染及び限定された細胞入手可能性の危険が最小化されるように、セルラインから得られた細胞を使用することができるであろう。ひじょうに驚くべきことに、本発明は、これらの及び他の関連の必要性を達成している。

発明の要約

本発明は、宿主に、不死化ヒト神経由来胎児セルラインからの細胞を移植することを含んで成る、宿主の治療方法を提供する。一般的には、このセルラインは

、ヒト胎児星状細胞、例えば、SVGセルラインから誘導されるであろう。これらの細胞は、しばしば、その宿主の中枢神経系に移植されるであろう。これらの細胞は、その宿

主の抗体に対して非透過性である膜により取り囲まれることができる。

本発明のいくつかの態様においては、細胞は、ペプチドをコードする核酸配列によりトランスフェクトすることができる。これらのペプチドは、一般的に、酵素、例えば、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase) 、又は成長因子、例えば、神経成長因子であろう。これらのペプチドは、疾患関連抗原であることもできる。これらの細胞は、治療又は予防の目的のために移植されることがある。いくつかの場合においては、これらの細胞は移植後に除去することができる。

図面の簡単な説明

図1は、インビトロにおけるSVG細胞の形態を表す。

図2は、SVG細胞内のSV 40 Tタンパク質に対する抗体の免疫ペルオキシダーゼ染色を表す。

図3は、低倍率における脳幹神経節内の針跡 (needle track) を表す。

図4は、脳幹神経節内の針跡の高倍率視野を表す。

図5は、脳幹神経節内の針跡の他の高倍率視野を表す。

図6は、側室の壁上のSVG細胞の巣を表す。

図7は、グリア線維酸性タンパク質に対する抗体により染色された側室の壁上に移植されたSVG細胞を表す。

図8は、抗-Tタンパク質抗体により染色された移植SVG細胞のインビボにおけるセクションを表す。

図9は、移植6ヶ月後のサルの脳の（ガドリニウム濃縮による）T₁加重MRIを表す。

図10は、インビボにおける移植SVG細胞の層上のチロシン水酸化

酵素ニューロンの成長を表す。

特定の態様の説明

本発明は、中枢神経系の細胞から誘導される不死化ヒト胎児細胞を移植することにより宿主を治療する方法を提供する。移植片拒絶、強度脳内炎症、及び腫瘍形成が、その中枢神経系内にこのような細胞の移植後に立証されていない。さらに、これらの細胞は、ニューロン転移及び神経突起伸長を誘導することが示されている。これは、これらの細胞が、ニューロン応答を刺激する向性因子を作り出すように機能していることを立証している。

中枢神経系の細胞から誘導された不死化ヒト胎児細胞の移植は、多くの疾患の治療の手段を提供する。例えば、パーキンソン病は、罹患宿主の脳幹神経節内へのこれらの細胞の移植により治療されることができる。移植細胞により作り出される向性因子 (tropic factors) は、ドーパミン作動性ニューロンの消滅を阻害し、そしてさらに、ドーパミン作動性ニューロンの再生を誘導することができる。ドーパミン作動性ニューロンの増加した集団は、パーキンソニズムを患う者の臨床的改善を提供することができる。あるいは、これらの移植された細胞は、チロシン水酸化酵素をコードするDNAによりトランスフェクトされることができる。これらの移植細胞によるチロシン水酸化酵素の発現は、これらの細胞がドーパミンを生産し、そして分泌することを可能にする。従って、これらの移植細胞は、黒質内のドーパミン濃度を増加させ、そしてドーパミン作動性ニューロンの損失の効果を制限し又は反転させることができる。

本発明に係る方法は、神経学的失調、例えば、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病、又は多発性硬化症を治療するために使用されることもできる。不死化ヒト胎児神経由来細胞が中枢神経系 (CNS

) と互換できるので、これらの細胞は、生理学的に活性なペプチドをコードするDNA配列によりトランスフェクトされ、そしてCNS内に移植されることができる。例えば、ハンチントン舞蹈病及び筋萎縮性側硬化病においては、ペプチドは、興奮性神経伝達物質、例えばグルタミン酸を遮断することができる。多発性硬化症においては、ペプチドは、髓鞘形成の向性刺激物質、例えば、血小板由来成長因子であることができ、又は、稀突起神経膠細胞の消滅を遮断することができる毛

様体向性因子であることができる。これらの疾患は、局所的病変よりもより一般化されるため、これらの細胞は、脳脊髄液に晒された表面上に移植されることができる。発現及び分泌の後、ペプチドは、その脳脊髄液の自然の循環によりその脳の表面全体にわたり洗浄されるであろう。移植に好適な部位は、側室、腰椎鞘 (Lumbar thecal) 領域、等を含む。アルツハイマー病においては、これらの細胞は、Rosenberg et al., Science, 242: 1575-1578 (1988) (引用により本明細書中に取り込む) により記載されたように、基底前脳のニューロンを支援するための神経成長因子を生産するために移植されることができる。

本発明に係る方法は、神経外部位内の細胞の移植により宿主を治療するために使用されることもできる。本発明のこの態様は、特に、宿主の予防的治療に有用である。不死化ヒト胎児神経由来細胞は、疾患関連抗原、例えば、米国特許第5,166,050号中に記載されたようなHIVの主中和ドメインを包含するHIV gp120ポリペプチドをコードするDNAによりトランスフェクトされることができる。これらの細胞は、次に、このトランスフェクトされたDNAによりコードされた抗原を発現し、そして分泌することができる。抗原は、移植された細胞により連続的に分泌され、そして強い免疫応答を顯出することができる。宿主を十分に免疫感作させる適當な時間間隔の後

、これらの細胞を除去することができる。

本明細書中に使用するとき、“宿主を治療する”は、疾患過程における、予防的、軽減的、そして治癒的仲裁を含む。宿主は、いずれかの温血哺乳類、例えば、ヒト、非ヒト靈長類、げっ歯類、等であることができる。

多種多様な疾患及び症候群が、本発明に係る方法により治療されることができる。一般的には、疾患は、神経学的疾患、例えば（パーキンソン病を含む）パーキンソニズム、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、多発性硬化症、筋萎縮性側硬化症、Gaucher病、Tay-Sachs病、ニューロパチー、脳腫瘍、等であろう。本発明に係る方法は、非-神経学的疾患の治療において使用されることもできる。例えば、本発明に係る方法は、感染性疾患、例えば、ウイルス、バクテリア、原生動物、及びこれらに類似するものに対して宿主を免疫感作するために使用さ

れることができる。不死化ヒト胎児神経由来細胞は、生理学的に活性なペプチド又は免疫学的エピトープを含むペプチドをコードするDNAによりトランスフェクトされることができる。本発明に係る方法は、ペプチド生産細胞を移植し、そして他のタイプのペプチド、例えば、成長ホルモンの、宿主への連続的なインビボにおけるデリバリーを提供するために使用されることができる。

本発明の方法により移植される細胞は、不死化されたヒト胎児神経由来細胞である。“神経誘導 (Neuro-derived)” は、不死化に先立って、細胞が神経学的細胞の表現型をもっていた、又は神経学的細胞型への分化に委ねられる胚細胞であったことを意味する。神経学的細胞型は、ニューロン、星状細胞、稀突起神経膠細胞 (oligodendrocytes) 、脈絡叢 (choroid plexus) 上皮細胞、等を含む。

胎児細胞は、選択的中絶の後に採取されることがある。中絶後

女性により寄贈された胎児は、ヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、並びにヘルペス・ウイルス1型及び2型を含むさまざまな感染性疾患について血清学的にスクリーニングされなければならない。胎児は、一般的には、妊娠期間の9-11週目（懷妊後7-9週目）であろう。胎児の齢は、超音波により確認されることがある。胎児は、胎児の脳外傷を最小化するために超音波のガイダンスの下で取り出されることがある。

取り出した後、この胎児の脳を、同定し、そしてその流産児から切除する。これらの細胞を、以下のように調製する。脳組織を、19ゲージ針を通して吸引し、そしてEagle's最小必須培地 (E-MEM, Gibco, New York, N.Y.) 中で2回洗浄した。これらの細胞を、ポリ-D-リシンにより処理された (0.1mg/ml 5分間) 培養皿上にプレートした。これらの細胞を、20%胎児ウシ血清、 $75\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、75ユニット/mlペニシリン、1%デキストロース及び $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ファンジゾン (fungizone) (Gibco) を補ったE-MEM上で増殖させた。不死化に先立って、細胞を、5% CO_2 湿環境中37°Cにおいてインキュベートする。当業者は、細胞を調製するための他の方法を使用することもできるということを認められるであろう。

本発明に係る方法により移植されるべき細胞は、さまざまな技術により不死化

されることができる。典型的には、これらの細胞は、以下のように不死化されるであろう。細胞カルチャーは、一般的に、Major and Vacante, J.Neuropath. and Exp.Neurol., 48: 425-436 (1988) (引用により本明細書中に取り込む) により記載されたように、先祖の神経及びグリア細胞、並びにニューロンを作り出すであろう。規則的な再フィードにより、これらの脳細胞は、数ヶ月間生存するであろうが、僅かな細胞増殖を示すであろう。細胞は、

SV 40欠失突然変異体によるトランスフェクションにより形質転換される。この突然変異体DNAは、複製起点 (ori-) を欠いており、分裂することができない。しかしながら、このDNAのトランスフェクションは、Gluzman, Cell, 23: 175-182 (1981) により記載されているように無制限増殖能力にこれらの細胞を形質転換するであろう。3週間胎児細胞カルチャーを増殖させた後に、これらの細胞は、Graham et al. Virol., 52: 456-467 (1973) により記載されたようにリン酸カルシウム沈降技術を用いてSV 40 ori-突然変異体を含む100 μ g/フラスコのプラスミドDNA (pMK16) によりトランスフェクトされることができる。あるいは、これらの細胞は、エレクトロポレーション、又はSambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988 (引用により本明細書中に取り込む) 中に記載されたような他のよく知られた技術、によりトランスフェクトされることができる。トランスフェクション後、これらのカルチャーを、1週間毎に再フィードしながら増殖させる。数週間後、プレートの別々の領域内のグリア細胞の増殖が、明らかになる。次にこれらの細胞を、形質転換細胞により発現されるSV 40 Tタンパク質を検出するための蛍光抗体検定により同定することができる (図2)。これらの細胞を、Tタンパク質陽性細胞の数における増加が検出されるまで10日毎に継代培養する。

形質転換された細胞は、連続的なセルラインの表現型を示すであろう。特に、これらの細胞は、18時間の寿命をもって、高い飽和密度まで増殖するであろう。これらの細胞は、形質転換された表現型又は非足場依存性増殖を示さない、しかしながら、それは、非突然変異体SV 40形質転換細胞に特徴的である。また、細胞形態は、このセルラインの樹立の経過の間に変更されない。これらの細胞のフ

オーカスは、一般的に、検出されない。特に有用なのは、American Type Culture Collection, Rockville MD, (A.T.C.C. CRL 8621) に寄託されたSVGセルラインからの細胞であり、これは、米国特許第4,707,448号（引用により本明細書中に取り込む）中に記載されている（図1）。以下、“SVG細胞”又は“SVGセルライン”は、セルラインA.T.C.C. CRL 8621から誘導体された細胞又は細胞系を意味する。誘導体は、セルラインA.T.C.C. CRL 8621の、サブクローン、複製物、又は遺伝子操作された突然変異体を意味する。

あるいは、これらの細胞は、本分野においてよく知られている他の技術により不死化ができる。例えば、エプスタイン-バール・ウイルスによる不死化を、米国特許第4,464,465号（引用により本明細書中に取り込む）中に記載されたように、用いることができる。Ori P及びOri Lyt複製起点を欠いたエプスタイン-バール・ウイルスが特に有用である。他の有用な不死化の方法は、Bartlett et al., Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA, 85 : 3255-3259 (1988)（引用により本明細書中に取り込む）により記載された、増殖制御のための細胞遺伝子、例えば、c-mycの過剰発現である。一般的に、移植に好適な形質転換細胞は、足場依存性であろうし、柔寒天中で増殖せず、そしてフォーカス形成を示さないであろう。

好ましくは、これらの細胞は、受容体宿主からの免疫応答を顕出しないであろうし、そしてそれ故に、移植後の宿主の免疫抑制を必要としないであろう。便利には、これらの細胞、例えば、SVG細胞は、MHCクラスII分子又はMHCクラスI分子を発現することができない。MHCクラスI又はクラスII分子の発現を欠く細胞は、免疫応答を顕出することができない。MHCクラスII分子の発現を欠く細胞は、SVG細胞から誘導され又は米国特許第4,707,448号（引用により本明細書中に取り込む）中に記載されたように組換えにより構築

されることができる。機能的なMHCクラスI又はクラスII分子の遺伝子は、非機能的なMHC分子配列を担持するベクターとの相同的組換えにより除去することもできる。得られた細胞は、それぞれ、機能的なMHCクラスI又はクラスII分子を生産しないであろう。あるいは、MHCクラスI又はクラスII分子の発現は、他

の細胞内で抑制されることができる。抑制は、例えば、MHCクラスI又はクラスII分子をそれぞれコードする核酸配列(DNA又はRNA)の転写又は翻訳を遮断するためのアンチセンス核酸配列により、達成されることがある。MHCクラスI又はクラスII分子遺伝子又はRNAの保存領域に相補的な核酸配列を構成的に発現する発現ベクターは、それらの遺伝子の発現を抑制するために細胞内にトランسفエクトされることがある。

形質転換細胞の組織学的起源が、次に、決定されることがある。特徴的には、星状グリア細胞は、グリア線維状酸性タンパク質、GFAPから成る中間フィラメントの存在により認識されることがある。稀突起神経膠細胞は、他方において、ミエリン生産細胞であり、そしてミエリンの成分であるガラクトセレブロシド、gal Cのそれらの合成により同定されることがある。

形質転換の後、これらの細胞は、移植のために調製されるであろう。これらの細胞は、生理学的に適合性の担体、例えば、細胞培養基(例えば、Eagle's最小必須培地)又はホスフェート・バッファー生理食塩水中に懸濁される。細胞密度は、一般的には、約 10^4 ～ 10^7 細胞/mlである。細胞懸濁液は、移植前にゆるくロックされる。移植されるべき細胞懸濁液の容量は、移植部位、治療目的、及び溶液中の細胞密度に依存して変化するであろう。例えば、パーキンソニズムの治療においては、 $5\mu l$ ～ $60\mu l$ の細胞懸濁液が、それぞれの注射において投与されるであろう。数回の注射を、各宿主に

おいて使用することができる。当業者は、適当な細胞投与量をどのように決定するかを理解するであろう。

これらの細胞は、脳の柔組織内に、脳脊髄液を含む空間、例えば、蜘蛛膜下空間又は室内に、又は神経外に、移植されることがある。本明細書中に使用するとき、用語“神経外に(extraneurally)”は、中枢神経系又は、末梢神経組織、例えば、腹膜神経節(celiac ganglion)又は坐骨神経(sciatic nerve)内にない宿主の領域を示すことを意図される。“神経外”領域は、末梢神経を含むことができる。“中枢神経系”は、硬膜(dura mater)内のすべての構造物を含むと意味される。

これらの細胞が脳内に移植されるとき、Leksell and Jernberg, Acta Neurochir., 52: 1-7 (1980) 及び Leksell et al., J.Neurosurg., 66: 626-629 (1987)

(これらの両方を引用により本明細書中に取り込む) 中に記載されたような定位法 (stereotaxic methods) が一般的に使用されるであろう。標的領域の位置決めは、一般的に、Leksell et al., J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry, 48: 14-18 (1985) (引用により本明細書中に取り込む) 中に記載されたような移植前MRIを含むであろう。標的座標は、移植前MRIから決定されるであろう。

移植に先立って、細胞の生存能力が、Brundin et al., Brain Res., 331: 251-259 (1985) (引用により本明細書中に取り込む) により記載されたように評価されることができる。簡単に言えば、細胞懸濁液のサンプル・アリコート (1-4 μ l) を、10 μ l の、アクリジン・オレンジと臭化エチジウムの混合物 (0.9% 生理食塩水中 3.4 μ g / ml の各成分; Sigma) と、ガラス・スライド上で混合する。この懸濁液を、血球計に移し、そして可視及び非可視細胞を、その計数チャンバー格子を可視化するために白光トランスー照明と併合

された、390nmにおけるエピー照明下で、蛍光顕微鏡を用いて、肉眼カウントした。アクリジン・オレンジは、生きた核を緑に染め、一方、臭化エチジウムは、死んだ細胞に侵入し、オレンジ-赤の蛍光をもたらす。細胞懸濁液は、一般的に、約98%以上の可視細胞を含まなければならない。

注射は、一般的には、23-27ゲージ針をもつ滅菌 10 μ l Hamilton シリンジにより行われるであろう。細胞を充填されたシリンジは、定位フレームの頭内に直接的に載せられる。この注射針は、頭蓋内の小さなバール孔を通して所定の座標まで下げられ、40-50 μ l の懸濁液が約 1-2 μ l / 分の速度において挿入され、そしてさらに 2-5 分間、その針をゆっくり抜く前に拡散に供される。しばしば、2つの別個の挿入 (deposits) が 1-3 mm 離されて、同一針の貫通に沿って行われ、そしてその標的領域上に散らされた 5 以下の挿入が、同一方向において容易に行われることができる。その針を抜いた後の外科手術の終わりに、宿主はそのフレームから取り外され、そしてその外傷が縫合される。予防的な抗生物質又は免疫抑制治療を、適宜投与することができる。

より一般的な神経学的失調の治療のために、細胞は、治療的化合物を発現するようにトランスフェクトされ、そして室 (ventricles) 又は腰椎膜 (lumbar theca) 内に移植されることができる。治療的化合物が、これらの細胞により分泌されるとき、脳脊髄液の自然の循環がその中枢神経系を通してその治療的化合物を洗浄して、一般的な治療手段を提供する。室内への移植は、Madrazo et al., New Engl.J.Med., 316: 831-834 (1987) 又は Penn et al., Neurosurgery, 22: 99-1004 (1988) (これらの両方を引用により本明細書中に取り込む) 中に記載されたような開口手術により達成されることができる。腰椎膜内への細胞の移植は、最も便利には、腰椎穿孔

を介しての抗腫瘍医療又はラジオグラフ造影剤の点滴注入も同様の標準的な手順により達成される。

いくつかの例においては、本発明に従って神経外に細胞を移植することが望ましいかもしれない。これらの細胞は、針又は内視鏡を通して経皮的に又は開口手術により、移植されることができる。当業者は、特定の用途のために細胞を移植する最も適当な方法を容易に理解するであろう。

これらの細胞は、移植に先立って膜により取り囲まれることができる。これらのカプセル化は、宿主の免疫系に対するバリアを提供し、そして移植片拒絶及び炎症を阻害する。細胞カプセル化のいくつかの方法を用いることができる。いくつかの場合においては、細胞は、個々にカプセル化されるであろう。他の場合においては、多数の細胞が、同一膜内にカプセル化されるであろう。これらの細胞が移植後に除去されるであろうとき、单一膜内に多数の細胞をカプセル化している比較的大きなサイズの構造が、移植された細胞の回復のための便利な手段を提供する。細胞カプセル化のいくつかの方法がよく知られており、例えば、欧州特許公開第301,777号、又は米国特許第4,353,888号、第4,744,933号、第4,749,620号、第4,814,274号、第5,084,350号、又は第5,089,272号 (これらのそれぞれを引用により本明細書中に取り込む) 中に記載されている。

細胞カプセル化の中の1の方法は以下のようなものである。形質転換された細胞を、アルギン酸ナトリウム (ポリアニオン性海藻エキス) と混合し、そして塩

化カルシウム中にエクストルードして、ゲル・ビーズ又は滴を作る。これらのゲル・ビーズを高分子量 ($MW 60-500 \times 10^3$) 濃度 (0.03-0.1% w/v) のポリアミノ酸、例えば、ポリ-L-リシンと、短時間 (3-20分) 間インキュベートして膜を形成する。形成されたカプセルの内部を、クエン酸ナトリウ

ムによる処理により再液化する。これらの細胞の周囲の単一膜は、高く透過性である (MW カット・オフ $200-400 \times 10^3$)。この細胞を含む単一膜カプセルを、1-3時間生理食塩水中でインキュベートして補獲されたアルギン酸ナトリウムをそのカプセルから外に拡散させ、そしてそのカプセルを平衡状態に膨張させる。得られたアルギネート減少カプセルを、低分子量のポリアミノ酸 ($MW 10-30 \times 10^3$) 例えば、ポリ-L-リシン (PLL) 又はキトサン (脱アセチル化キチン; $MW 240 \times 10^3$) と反応させて、相互作用された低透過性の膜 (MW カット・オフ $40-80 \times 10^3$) を作り出した。この2重膜にカプセル化された細胞を次に、先に記載したように2~3週間、E-MEM中で培養する。

アルギン酸ナトリウム・ビーズに特別に言及したが、それが入れられる媒質中の条件における変化により形状を保持する塊を形成することができるようゲル化することができるいずれかの非毒性の水溶性物質を用いることができることは当業者に明らかであろう。このようなゲル材料は、一般的に、その表面層が架橋して、反対電荷のポリマーに晒されたときに永久膜を形成することができるよう、アニオン又はカチオン基を形成するように容易にイオン化されるいくつかの化学的部分を含んで成る。ほとんどの多糖類ガム、天然と人工の両方は、正に帶電した反応基、例えば、アミノ基を含むポリマーにより架橋されることができる。アルギン酸ナトリウム・ガムと反応することができる架橋生体適合性ポリマーは、ポリリシン及び他のポリアミノ酸を含む。形成された膜の透過性の程度は、望ましい分子量をもつポリアミノ酸を注意して選択することにより制御されることができる。ポリ-L-リシン (PLL) は、好ましいポリマー材料であるが、他は、キトサン及びポリアクリレートを含む。分子量は、典型的には、約 10^4 ~約 10^6 の間で変化する。

本発明のいくつかの態様においては、移植された細胞は、ペプチドをコードするDNA配列によりトランスフェクトされることができる。ペプチドは、直接的な治療化合物、例えば、ハンチントン舞蹈病の治療における運動阻害物質であることができる。あるいは、ペプチドは、治療的化合物の生産を触媒する酵素、であることができ、例えば、このDNAは、パーキンソニズムの治療において有効であるドーパミンの合成を触媒するチロシン水酸化酵素をコードすることができるであろう。このDNAは、向性因子、例えば、神経成長因子、阻害的成長因子、又は脳腫瘍の治療において有用なサイトカインをコードすることもできる。

一般的には、このDNA配列は、転写プロモーターと転写ターミネーターに作用可能な状態で連結されるであろう。移植された細胞内でのこのDNAの表現は、構成的又は誘導的であることができる。これらの特徴をもつさまざまな発現ベクターは、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1988 (先に、引用により本明細書中に取り込んだ) 中に記載されたように、細胞のトランスフェクションのためのDNA) 例えば、プラスミド・ベクター pTK2、pHyg、及びpRSVneo、シミアン・ウイルス40ベクター、ウシ乳頭腫ウイルス・ベクター又はエプスタイン-バール・ウイルス・ベクターを担持することができる。これらのベクターは、標準的な方法、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム仲介トランスフェクション、ポリブレン・トランスフェクション、等により細胞内に導入されることができる。

以下の実施例を、限定のためでなく、説明のために提供する。

実施例1

本実施例は、アカゲザル内への移植のためのSVG細胞 (A.T.C.C.CRL 8621) の調製について記載する。これらの細胞は、マイコプラ

ズマ、HIV-1、B型肝炎ウイルス、シミアン・ウイルス40、単純ヘルペス・ウイルス、サイトメガロウイルス、及びJCウイルスについてスクリーニングされた。

SVG細胞を集密まで増殖させた。細胞増殖は足場依存性であった。フォーカス形成は、生じず、そして細胞の形態は均一であった。これらの細胞を、Hank'sバランス塩溶液中の0.01M EDTA (Versene Buffer) 中の0.05%トリプシンによる

消化により組織培養プレートから取り出した。細胞を遠心分離により集め、3回洗浄し、そしてホスフェート・バッファー生理食塩水中に再懸濁させた。最終的な細胞密度は 10^6 細胞/mlであった。この細胞懸濁液を移植まで4℃において保存した。

実施例2

本実施例は、6匹のアカゲザルの脳幹神経節内へのSVG細胞の移植について記載する。これらの移植は、外科的合併症を伴わずに定位法により行われた。

これらの動物を、最初にケタミン (ketamine) により麻酔し、そして外科手術の経過の間イソフルオリン (isofluorine) ガス麻酔上で維持した。これらの動物を、その定位フレーム (kopf) 内に置き、そして移植のための標認点を、その定位座標を通じて確立した。上矢状静脈洞 (superior sagittal sinus) を、その中心線を確立するために露出させた。マークを、両側上、尾状核 (caudate) と被殻 (putamen) の上にその頭蓋上に置いた。これらの座標は、以下のようにあった：APは、0の前方+24mmであった。横の座標は、尾状核について上記中心線から5mmであり、そして被殻について上記中心線から10mm横であった。

5つのバール孔を作った。1は、上矢状静脈洞上に行い、2つを尾状核上に、そして2つを被殻上に行った。2つの異なる移植技術

を使用した。

1. 26ゲージ針をつけた 10μ lハミルトン・シリンジ又は23ゲージ針をもつ 50μ lハミルトン・シリンジを使用した。脳SVG細胞の右側上に移植した。これらのシリンジを使用して、2つの挿入 (deposits) を、その被殻内に行った。1の挿入は、側被殻内にあり、そして2番目は中央被殻にあった。これらの針をその皮質から18mm下方に下げ、次に 10μ lの細胞懸濁液を、kopfマイクロインジェクターを使用して移植した。最初の移植後、その針を、1分間当たり1mm、3分間で取り出し、そして次に、その細胞懸濁液の 10μ lの第2の注射を行った。この第2の注射の後、その針を1分間当たり1mmにおいて取り出した。第2の移植を同一技術により同一座標における反対側の被殻内で行った。

その被殻に注射した後、その尾状核内への移植を、同一細胞懸濁液により行つ

た。2つの注射を、側及び中央面内で、その尾状核内に行った。この注射の深さは、15mmであり、そして $10\mu\text{L}$ を移植した。このシリンジを3分間、1分間当たり1mmで引き抜き、次に、その細胞懸濁液の $10\mu\text{L}$ の第2の注射を行った。非-トランسفェクトSVG細胞を、被殻内に移植し、そしてトリプシン水酸化酵素遺伝子によりトランسفェクトされたSVG細胞を、被殻内に移植した。これらの細胞の濃度は、1mL当たり 2×10^6 細胞であった。

2. 針をつけたシリンジを用いた移植の使用に加えて、22ゲージ針に接続された青の中が見えるチューブのカニューレを作った。このチューブを、0のデッド・ボリュームのコネクターを用いて1ccのツベルクリン・シリンジに接続した。標的内への挿入の後、この針を注入に先立って15分間放置した。この細胞懸濁液を保持するHarvard注入ポンプを、次に $0.2\mu\text{L}/\text{分}$ において開始させた。 $0.2\mu\text{L}/\text{分}$ において15分間の注入の後、この速度を、 $0.4\mu\text{L}/\text{分}$ に

増加させ、そして100分間続けた。この注入の終了後、針を、引き抜きに先立つて30分間その場に放置した。次に、これらの針を、その脳からひじょうにゆっくりと引き抜いた。

この外傷を、灌ぎ、そして次に解剖層内に閉じた。これらの動物を麻酔から醒まし、そして外科手術の20分後にそれらの元の檻に移した。

実施例3

本実施例は、移植1ヶ月後に殺したサルの中の2における移植されたSVG細胞の首尾よい移植について立証する。これらの移植された細胞は、組織学的に健康であった。腫瘍形成又は炎症の証拠は全く存在しなかった。

これらの移植領域内の脳組織を以下のよう検査した：

組織病因学的研究のために、動物を、ペントバルビタールの過剰投与(460mg、静脈内)により殺し、15mLの氷冷ホスフェート・バッファー生理食塩水(PBS)その後の10%ホルマリンにより上行大動脈を通して灌流した。これらの脳を素早く取り出し、6mmの冠状セクションに切断し、そして同一固定剤中で30分間後固定した。これらの組織スライスを、PBS中30%スクロース中で48時間灌ぎ、そして次に-70°Cにおいて急速冷凍した。組織を、冷却マイクロトーム内で $40\mu\text{m}$

の冠状セクションに切断し、そして一連のセクションを、PBS中に集めた。これらのセクションを、チロシン水酸化酵素、グリア線維酸性タンパク質及びT-プロテインに対する抗体との免疫組織化学のために処理した。TH-IRについて検査されたものに隣接するセクションを、ヘマトキシリン及びエオシンにより染色した。インプラントを含む組織のいくつかのブロックを、5 μmパラフィン・セクション内で処理し、そして先に記載したように染色した。

図3は、低倍率におけるサルの中の1の脳幹神経節内の針跡を表

す。この針跡のより高い倍率の視界（図4-5）は、その跡内の可視SVG細胞を表す。これらの細胞は、インビトロにおけるSVG細胞により示されるような多数の核小体を含む大きな核により容易に同定される。この移植細胞の形態は、周囲の細胞の形態も著しく異なっている。

実施例4

本実施例は、4つの残りのサルの移植の1ヶ月後の脳のMRI評価について記載する。腫瘍形成の証拠は、サルのいずれにおいても全く存在しなかった。

麻酔の導入後、サルを、標準的なMRIフレーム内に置いた。造影剤によらないT₁及びT₂加重画像とガドリニウムによるT₁加重画像を、1.5 Teslaマグネット（Signa）を用いて行った。これらの走査は、節又は腫瘍形成の証拠を全く現わさなかった（図9）。

実施例5

本実施例は、中枢神経系内に移植されたSVG細胞の機能について立証する。宿主のニューロンは、移植された細胞、ニューロンのドーパミン作動性体の方に転移し、そして宿主起源のドーパミン作動性過程は、その移植された細胞に伸ばされた。

先の実施例2中に記載したようなSVG細胞移植を受容した存在サルの中の2を、記載したように殺した。これらの脳を、先に記載したように無傷で取り出し、そして切片化した。

各セクションを、ゼラチン・コート・スライド上に置いた。代表セクション、ヘマトキシリンとエオシンにより染色してその解剖学的構造を特徴付けた（図6

）。移植された細胞は、多数の核小体をもつ大きな核をもつ特徴的なSVC形態を示した。隣接セクションは、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) 、SV 40 Tプロテイン、又はチロシン水酸化酵素に対するいずれかのモノクローナル抗体により

染色した。次に、これらのセクションを、ヘマトキシリン単独で対染色した。図7は、GFAP、星状細胞系の細胞質タンパク質に対する抗体により染色された隣接セクションを表している。この星状細胞起源は、濃縮細胞質染色により立証される。これらの細胞の起源は、抗-Tプロテイン抗体により染色された移植細胞を明瞭に示す図8中にも表わされる。

尾状核及び被殻内の移植細胞は、先に記載したように抗-Tプロテイン抗体により可視化され、そして容易に同定された。SVC細胞は、全てのサルの側室の壁上にも同定された。ドーパミン作動性ニューロンは、移植された細胞の方への軸索の外成長を示した（図10は、インビボにおけるSVC細胞の層内の抗チロシン水酸化酵素抗体により染色されたチロシン水酸化酵素ニューロンを表している）。ドーパミン作動性ニューロン体は、移植されたSVC細胞の領域内にも存在した。この軸索外成長 (Neurite outgrowth) 及びニューロン体の存在は、これらのSVC細胞が、ニューロン転移及びニューロン過程の伸長を引き起こす神経向性因子を生産したということを示している。

炎症、移植拒絶、腫瘍又は節形成の証拠は、いずれのセクションにおいても全く発見されなかった。

実施例 6

本実施例は、SVC細胞の個々のカプセル化及び移植のための細胞の調製について記載する。これらの細胞を、アルギン酸ナトリウム・ペレット内にカプセル化する。

SVC細胞を、培養皿内で集密まで増殖させる。これらの細胞を、Dulbecco'sホスフェート-バッファー生理食塩水 (PBS) 中の0.05%トリプシン及び1 mM EDTAによりその培養皿から取り出した。これらの細胞を、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、0.1%グルコース、及び5%胎児ウ

シ血清を補ったPBS中に懸濁する。これらの細胞を、遠心分離により集め、先に記載したように懸濁液中で2回洗浄し、そして遠心分離してペレットにした。

この遠心分離管の底に残った細胞ペレットを、1.5% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液 (Keltone LV® by Kelco, Ltd., Chicago, Illinois) の5mL中に再懸濁する。このアルギネート細胞懸濁液を、50mLの1.5% (w/v) CaCl_2 溶液中にエクストルードする。この懸濁液の球状滴を、エアー・ジェットーシリンジ・ポンプ滴発生装置により形成する。この装置により、細胞-アルギン酸ナトリウム懸濁液を、空気が制御された速度 (9 L/分)において流れる被覆管 (3 mm内径) の内側に置かれた22-ゲージの針を通してエクストルードする。液滴は、(20cc/時間において) 上記シリジ・ポンプにより針の端から外に押し出されるので、それらの滴は、速く流れる空気流により作られた剪断力により引き離される。針の先端の CaCl_2 溶液の表面上8 cmに保ち、均一で、球状のゲル滴が約300-1000ミクロンの直径をもつよう形成されることを確保した。

ゲル化されたマイクロビーズのサンプルを、換算アイーピース (eye-piece) を装着された解剖顕微鏡 (Wild Heerbrugg Model M8) を用いてサイズと形状の一貫性について検査する。固定化細胞を含むアルギン酸カルシウムゲル・ビーズを、円錐の底をもつ50mLのプラスチック遠心分離管に移した後、これらのビーズを、0.1% (w/v) CHESと1.1% (w/v) CaCl_2 溶液のそれぞれ30mLで洗浄する。この上清容量を、真空アスピレーターを用いてそれぞれ洗浄した後に減少させる。半-透過性カプセル膜を、8分間、水性0.05% (w/v) PLL溶液 (PLLのM/V = 22.000) とそのゲル滴を反応させることにより形成する。このPLL溶液の添加の後、この遠心分離管に蓋をし、そしてそれらのカプセルが共にくっつかないように、その反

応の経過の間、端と端を接して手でたたいた。得られたマイクロカプセル、直径300-1000ミクロンを、0.1% CHESと1.1% CaCl_2 のそれぞれ30mL及び等張性生理食塩水の2つの30mLアリコートで洗浄する。このカプセル化された細胞を、4分間30mLの0.03% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液と接触させて、それらのカプ

セル上に外層を形成させた。このマイクロカプセルの内側を、6分間30mLの0.05Mクエン酸ナトリウム溶液で液化する。これらのマイクロカプセル、直径400-1400ミクロンを、生理食塩水中で7回洗浄して過剰のシトレーントを除去し、そして次に5つの1mLアリコートに分けた。それぞれのアリコートを、等温Series 400 CO₂インキュベーター（モデル413D, Fisher Scientific Co., Nepean, Ontario）内で37°Cにおいて25cm³の培養フラスコ内の10mL DMEM培地中でインキュベートする。

実施例7

本実施例は、トリプシン水酸化酵素をコードする核酸によるSVG細胞のトランスフェクトについて記載する。チロシン水酸化酵素（tyrosine hydroxylase）を発現するSVG細胞は、トランスフェクション後のカルチャー中に同定された。

SVG細胞の非集密単層を、サイトメガロウイルス・プロモーターに作用可能な状態で結合されたヒト・チロシン水酸化酵素・cDNAを含むプラスミドによりトランスフェクトした。これらの細胞を、リン酸カルシウム沈降によりトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後に、カルチャーからの細胞を同定し、そしてチロシン水酸化酵素に対する標識抗体により染色した。チロシン水酸化酵素を発現する細胞が同定された。

本明細書に述べた全ての刊行物、特許及び特許出願を、あたかも、それぞれの個々の刊行物、特許又は特許出願が特別に且つ個々に

引用により本明細書中に取り込まれることを意図されるような程度において、引用により本明細書中に取り込む。

これまで、本発明を、理解の明確さを目的として説明と実施例によりいくぶん詳細に説明してきたが、添付クレームの範囲内で、特定の変更及び修正が行われることができるということは、自明であろう。

【図1】

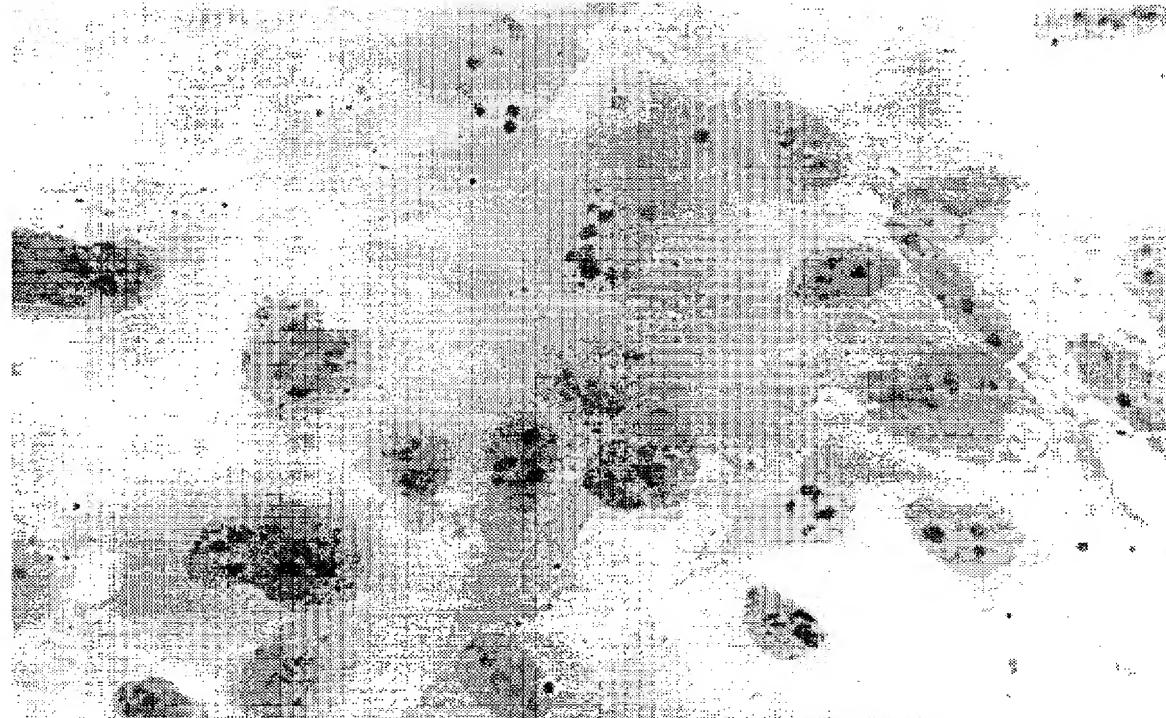


FIG. 1.

【図2】

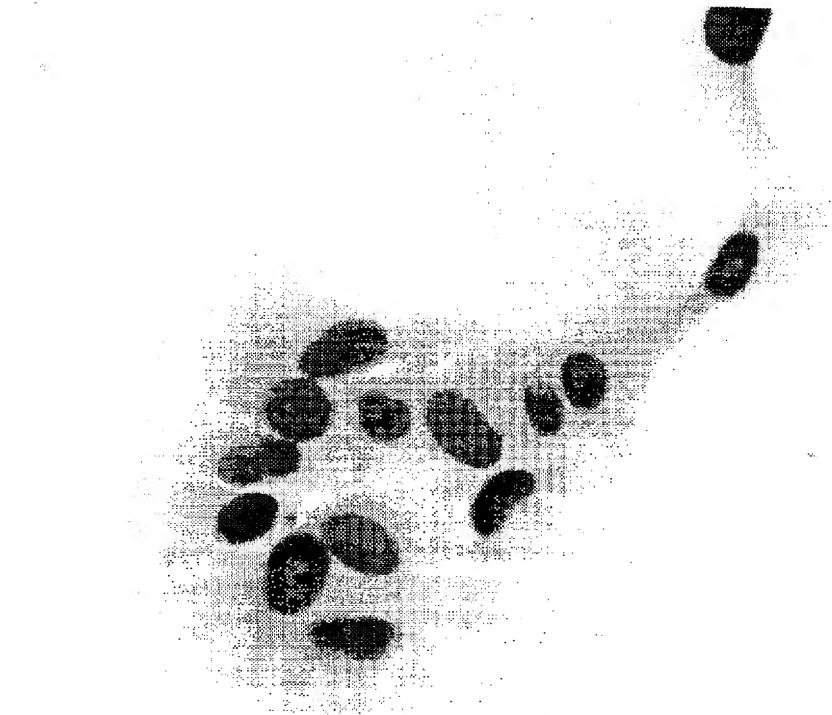


FIG. 2.

【図3】

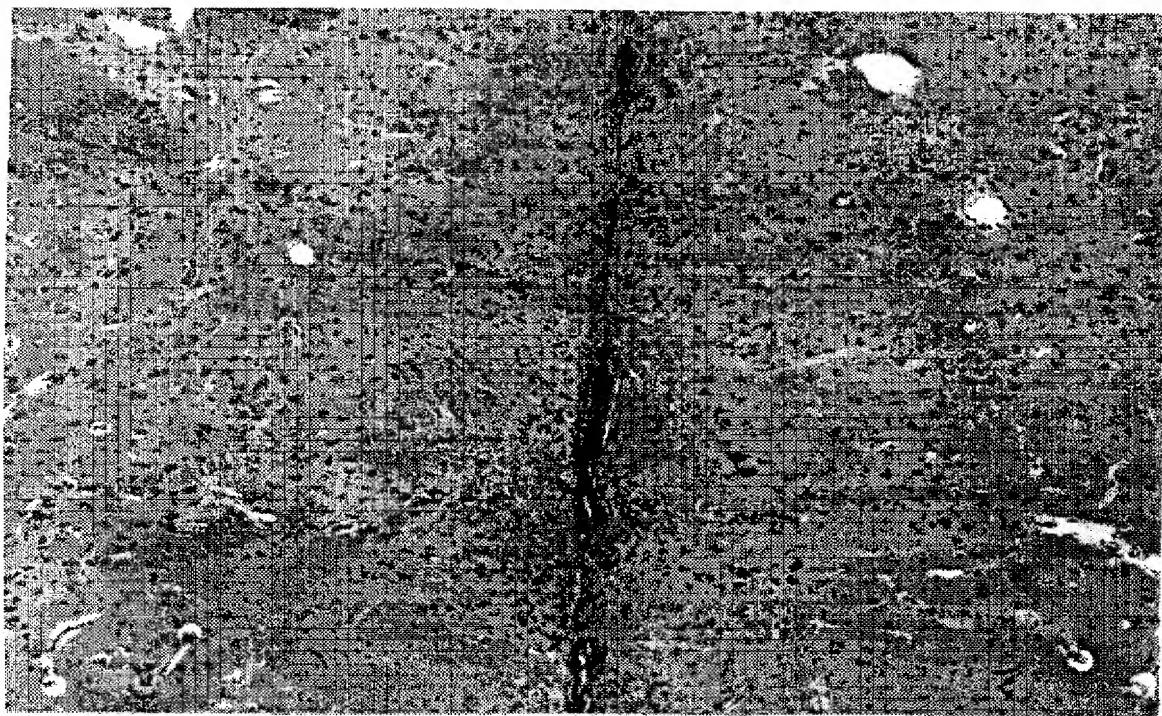


FIG. 3.

【図4】

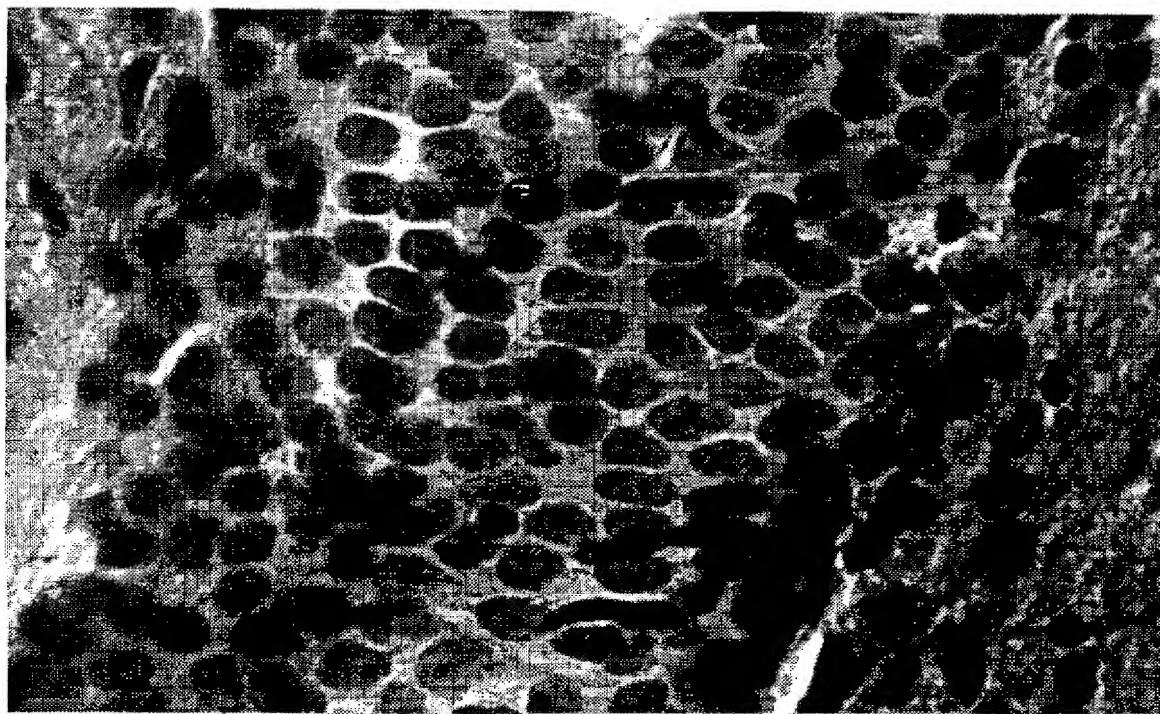


FIG. 4.

【図5】

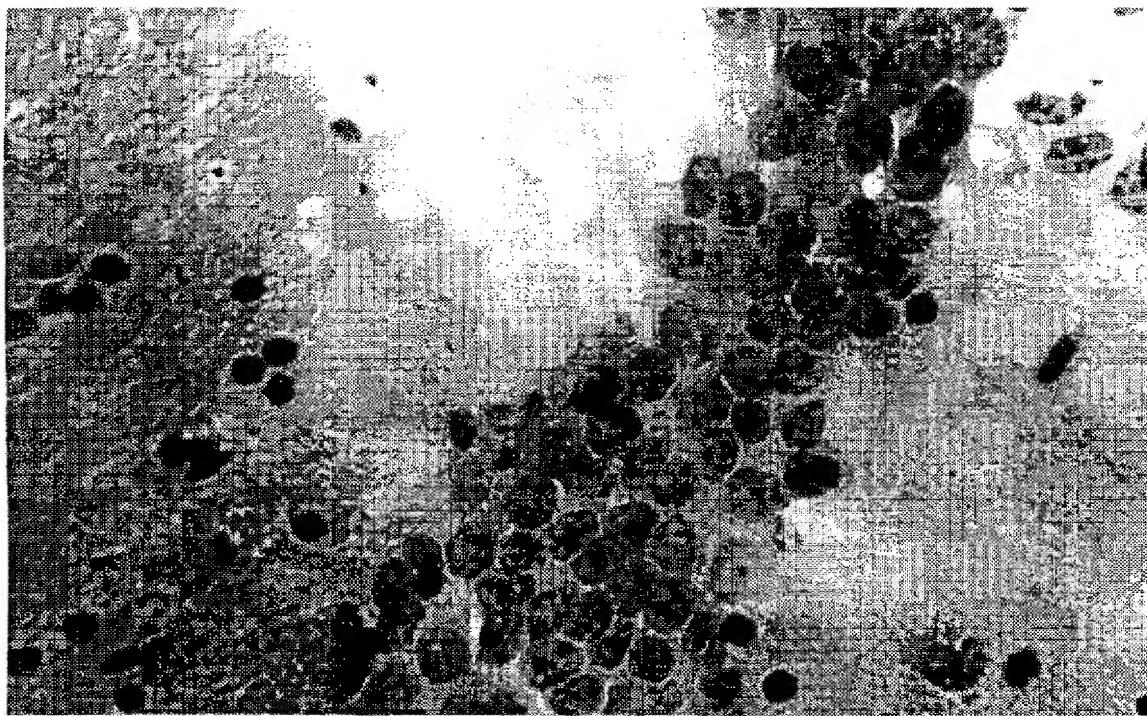


FIG. 5.

【図6】

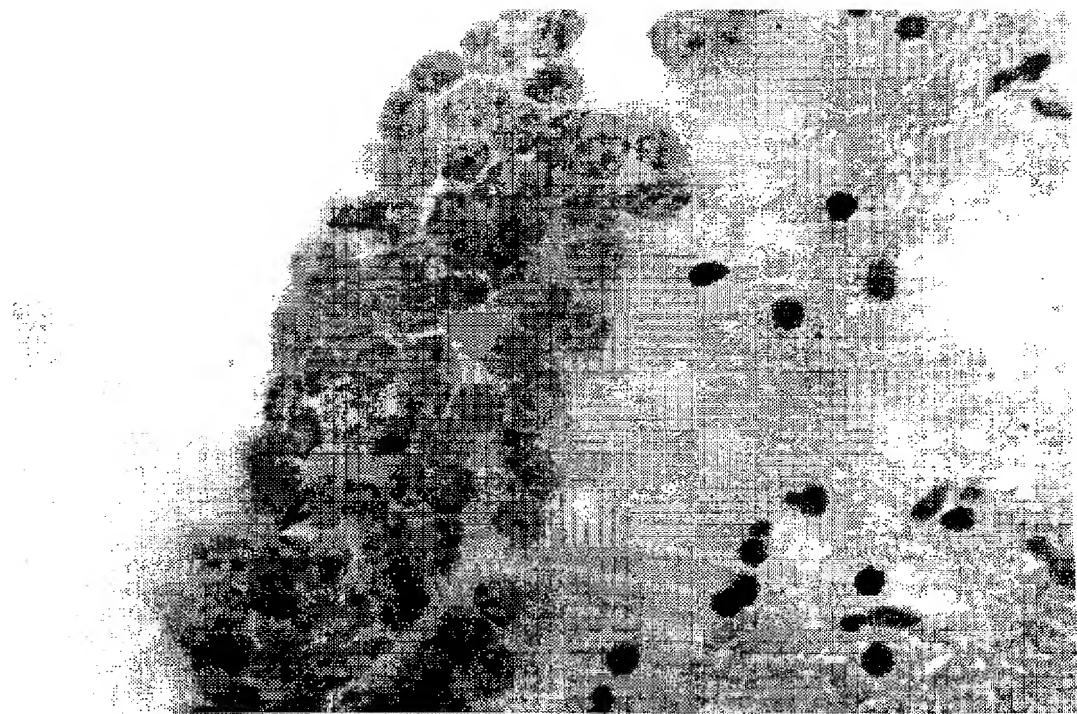


FIG. 6.

【図7】



FIG. 7.

【図8】

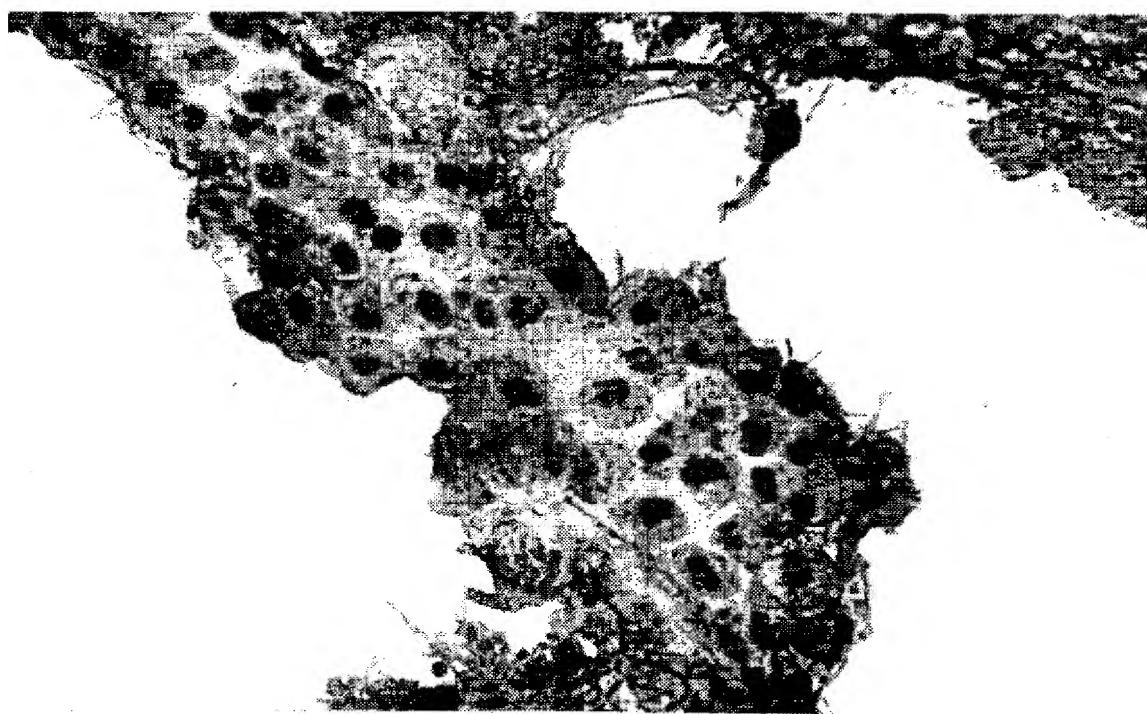


FIG. 8.

【図9】

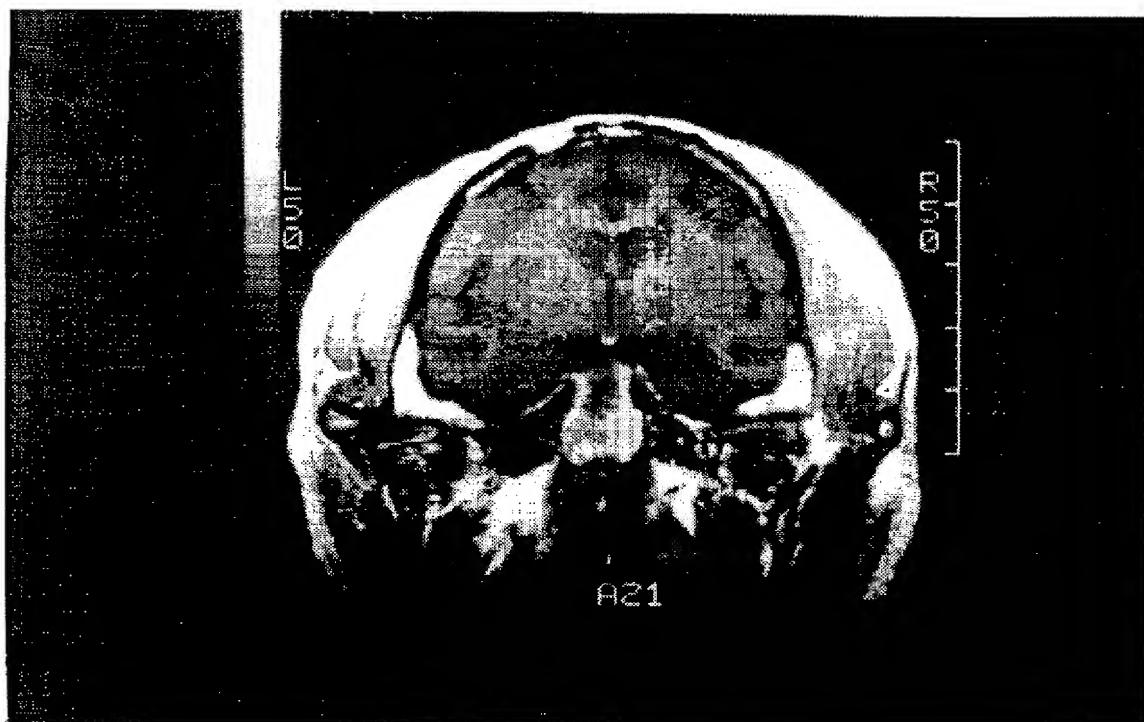


FIG. 9.

【図10】



FIG. 10.

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年5月5日

【補正内容】

請求の範囲

1. パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側硬化症又は多発性硬化症を患う宿主を治療する方法であって、その宿主にSVGセルラインからの細胞を移植することを特徴とする方法。
2. 細胞が、抗体に対して非透過性である膜によりカプセル化されている、請求項1に記載の方法。
3. 細胞が宿主の中枢神経系内に移植される、請求項1に記載の方法。
4. 細胞が宿主の脳幹神経節内に移植される、請求項3に記載の方法。
5. 細胞が宿主の腰椎膜内に移植される、請求項3に記載の方法。
6. 細胞が宿主の側室内に移植される、請求項3に記載の方法。
7. 細胞が神経外に移植される、請求項1に記載の方法。
8. 細胞が皮下に移植される、請求項7に記載の方法。
9. 細胞が、それらの細胞による発現のために、ペプチドをコードする核酸配列を含んで成るベクターによりトランスフェクトされている、請求項1に記載の方法。
10. ペプチドが酵素である、請求項9に記載の方法。
11. ペプチドが疾患関連抗原である、請求項9に記載の方法。
12. 移植後に細胞を除去することをさらに含んで成る、請求項11に記載の方法。
。
13. 細胞が、抗体に対して非透過性である膜によりカプセル化される、請求項11に記載の方法。
14. 宿主においてパーキンソン病を治療するための方法であって、
、SVGセルラインから誘導された細胞をその宿主の脳幹神経節内に移植することを特徴とする方法。
15. SVG細胞が、転写プロモーターと転写ターミネーターに作用可能な状態で

結合されたチロシン水酸化酵素をコードする核酸配列によりトランスフェクトされる、請求項14に記載の方法。

16. 宿主が、細胞の移植後に免疫抑制治療を必要としない、請求項14に記載の方法。

17. パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側硬化症又は多発性硬化症である宿主の中枢神経系における病変を治療する方法であって：

SVGセルライン由来の細胞の懸濁液をその中枢神経系に注射すること、を特徴とする方法。

18. 病変が、中枢神経系の領域に制限され、そして細胞がその領域内に注射される、請求項17に記載の方法。

19. 病変がパーキンソン病である、請求項17に記載の方法。

20. 細胞が輸注ポンプにより注射される、請求項17に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte...al Application No PCT/US 94/03938
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 A61K48/00 A61K35/54 //C12N5/10, C12N15/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 A61K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 06631 (CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY) 16 May 1991	1,2, 4-10,19, 20,22,23
Y	see page 25, line 4 - page 26, line 18; claims 1-16,23-28; example 8 see page 28, line 12 - line 16 see page 29, line 20 - page 30, line 5 see page 30, line 15 - page 31, line 10 ---	3,11-18, 21
Y	US,A,4 707 448 (E.O. MAJOR) 17 November 1987 cited in the application see column 8, line 65 - line 68; claims see column 10, line 11 - line 16 ---	3,21 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in Annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 July 1994		Date of mailing of the international search report 22.07.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ryckebosch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.
PCT/US 94/03938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, November 1989, WASHINGTON US pages 9011 - 9014 J.-A. WDLFF ET AL. 'GRAFTING FIBROBLASTS GENETICALLY MODIFIED TO PRODUCE L-DOPA IN A RAT MODEL OF PARKINSON DISEASE.' see page 9011, right column, line 4 - line 38 see page 9013, right column, line 60 - page 9014, left column, line 30 ---</p>	11-18
X	<p>US,A,5 032 407 (T.E. WAGNER ET AL.) 16 July 1991 see column 3, line 34 - line 55 see column 4, line 48 - line 57 see column 5, line 42 - line 46; examples 3,4,6 see column 9, line 47 - line 50 see column 9, line 62 - column 10, line 34 ---</p>	1,11,13, 19,20,23
A	<p>WO,A,89 09816 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 19 October 1989 see page 6, line 25 - page 10, line 28; claims 7-10 ---</p>	1-23
A	<p>WO,A,90 05781 (Baylor COLLEGE OF MEDICINE) 31 May 1990 see claims; example 1 ---</p>	1-23
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 11, 13 March 1989, Columbus, Ohio, US; abstract no. 89851p, K. UCHIDA ET AL. 'TRANSFECTION OF TYROSINE HYDROXYLASE cDNA INTO C6 CELLS.' page 207; see abstract & PROC. JPN. ACAD., SER. B vol. 64, no. 9, 1988 page 290-293 ---</p>	1-23
O,P, X	<p>JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, ABSTRACT SUPPL. 17E (KEYSTONE SYMPOSIUM ON GENE THERAPY, APRIL 12-18, 1993) NEW YORK, N.Y., US page 227 C.S. TORNATORE ET AL. 'IMPLANTATION AND SURVIVAL OF A HUMAN FETAL ASTROCYTE CELL LINE IN THE BASAL GANGLIA OF THE NON-HUMAN PRIMATE, RHESUS MONKEY.' see abstract SZ 115 -----</p>	1-10,16, 18-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US94/03938
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Remark : Although claims 1-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 	
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/US 94/03938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9106631	16-05-91	US-A- AU-A-	5202120 6918891	13-04-93 31-05-91
US-A-4707448	17-11-87	NONE		
US-A-5032407	16-07-91	NONE		
WO-A-8909816	19-10-89	DE-T- EP-A,B JP-T- US-A-	68907220 0428519 3504799 5270191	27-01-94 29-05-91 24-10-91 14-12-93
WO-A-9005781	31-05-90	AU-A- EP-A- JP-T-	4669189 0445218 4501960	12-06-90 11-09-91 09-04-92

フロントページの続き

(72)発明者 トーナトア, カルロ エス.
アメリカ合衆国, メリーランド, 20782,
ユニバーシティー パーク, クラゲット
ロード 4315

(72)発明者 バンキーウィッツ, ク里斯
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94596,
ウォールナット クリーク, キャッスル
クレスト ロード 30

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成13年9月18日(2001.9.18)

【公表番号】特表平8-509215

【公表日】平成8年10月1日(1996.10.1)

【年通号数】

【出願番号】特願平6-523361

【国際特許分類第7版】

A61K 48/00

C12N 5/10

15/09 ZNA

// A61K 31/70 AAM

35/30

【F I】

A61K 48/00

31/70 AAM

35/30

C12N 15/00 ZNA A

5/00 B

手 続 様 正 善

平成13年9月19日

特許庁長官 及川耕造 殿

1. 事件の表示

平成6年特許第523361号

2. 補正をする者

名称 アメリカ合衆国

3. 代理人

住所 〒105-8420 東京都港区虎ノ門二丁目5番1号 虎ノ門37森ビル
電話 03-5470-1900氏名 弁護士 (751) 石田 敏 

4. 特許により増加する請求項の数 54

5. 前記対象書類名

請求の範囲

6. 増正対象項目名

請求の範囲

7. 増正の内容

請求の範囲を別紙の通り変更する。

8. 添付書類の目録

請求の範囲

1項

請求の範囲

1. パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症又は多発性硬化症を患う患者を治療するため、移植されるべきSVG セルラインの細胞を含む医薬組成物。

2. 前記細胞が、抗体に対して不透過性である膜により封入されている、請求項1に記載の医薬組成物。

3. 前記細胞が取扱店主の牛膝神経節内に移植される、請求項1に記載の医薬組成物。

4. 前記細胞が取扱店主の脛神経節内に移植される、請求項3に記載の医薬組成物。

5. 前記細胞が取扱店主の腰椎管内に移植される、請求項3に記載の医薬組成物。

6. 前記細胞が骶神経節内に移植される、請求項3に記載の医薬組成物。

7. 前記細胞が神経外に移植される、請求項1に記載の医薬組成物。

8. 前記細胞が皮下に移植される、請求項7に記載の医薬組成物。

9. 前記細胞が、それらの細胞による発現のために、ペプチドをコードする核酸配列を含むベクターによりトランスクレクションされている、請求項1に記載の医薬組成物。

10. 前記ペプチドが幹細胞である、請求項9に記載の医薬組成物。

11. 前記ペプチドが筋肉細胞である、請求項9に記載の医薬組成物。

12. 移植後に前記細胞を除去する、請求項9に記載の医薬組成物。

13. 前記細胞が、抗体に対して不透過性である膜により封入される、請求項1に記載の医薬組成物。

14. 患者においてパーキンソン病を治療するための医薬組成物であって、上記患者の脇神経節内に移植されるべきSVG セルライン由来の細胞を封入、封入医薬組成物。

15. 前記SVG 細胞が、乾燥プロテーターと乾燥クーラーポーターに6月可能な状態で結合されたチコシン・ヒドロキシラーゼをコードする核酸配列によりトラン

スフェクトされる、請求項14に記載の医薬組成物。

16. 前記第2が、前記細胞の移植後に免疫抑制治療を必要としない、請求項14に記載の医薬組成物。

17. パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、解離性僵硬化症又は多発性硬化症である患者の中枢神経系における病変を治療するための医薬組成物であって、
上記14に記載の注射されるべき、SFG-セルライン由来の細胞の懸濁液を含む、前記医薬組成物。

18. 前記病変が、前記中枢神経系の細胞に制限され、そして前記細胞が前記細胞内に付着される、請求項17に記載の医薬組成物。

19. 前記病変がパーキンソン病により引き起こされる、請求項17に記載の医薬組成物。

20. 前記細胞が給注バンクにより注記される、請求項17に記載の医薬組成物。

21. 生物学的に活性なペプチドをコードする異種核酸配列を含む、非腫瘍原性及び非炎症性不活性ヒト神経細胞セルラインであって、上記セルラインが、
(1) 上記異種核酸配列を発現することができ、そして
(2) 哺乳動物において神経転移又は中枢神経病変を誘導することができる、前記セルライン。

22. 前記セルラインがアグリーベル系である、請求項21に記載のセルライン。

23. 前記セルラインがヒト胎児星状細胞由来である、請求項21又は22に記載のセルライン。

24. 前記生物学的に活性なペプチドが酵素である、請求項21～23のいずれか1項に記載のペルライン。

25. 前記生物学的に活性なペプチドが、疾患関連抗原である、請求項21～23のいずれか1項に記載のセルライン。

26. 前記生物学的に活性なペプチドが、チロシン・ヒドロキシラーゼである、請求項21～23のいずれか1項に記載のセルライン。

27. 前記核酸が、転写プロモーターに作用可能な状態で連結されている、請求項21～26のいずれか1項に記載のセルライン。

28. 前記セルラインがSFG-IEセルラインである、請求項6に記載のセルライン。

29. 前記セルラインがATCC株Reoゾラスミドを発現することができる、請求項26に記載のセルライン。

30. 前記セルラインが、さらにセロトニンを発現することができる、請求項21～25のいずれか1項に記載のセルライン。

31. 請求項21～30のいずれか1項に記載のセルライン由来の細胞、及び
酵素として酵素される細胞
を含む、移植可能な細胞。

32. 前記細胞が、抗体に対して不適合性の膜により封入される、請求項31に記載の移植可能な細胞。

33. 前記膜が、アルギメント・グル膜である、請求項32に記載の移植可能な細胞。

34. 神経細胞の外成長及び生存を促進するための細胞物であって、医薬として
酵素される細胞中、神経突起の外成長及び生存を促進するために有効な量、不
死化ヒト胎児神経細胞セルラインを含む、前記細胞。

35. 前記不死化ヒト胎児神経細胞セルラインが、以下の抗原性材料、ビメチン (Vimentin)、MHC クラスI、及び T プロテインによりさらに特徴付けられる、請求
項34に記載の細胞。

36. 前記不死化ヒト胎児神経細胞セルラインがSFG 又はSFG-IEである、請求項34
又は35に記載の細胞。

37. 前記セルラインが異種タンパク質を発現する、請求項34～36のいずれか1
項に記載の細胞。

38. 神経フィラメントの発現及び神経伝達物質の分泌を特徴とする造血のセル
ラインをさらに含む、請求項34～37のいずれか1項に記載の細胞。

39. 血管内皮細胞のペルラインが、ECM 又はPECである、請求項34に記載の細胞。

40. 血元有効量が、10⁷ ～10⁸ の間の細胞密度をもつ細胞懸濁液 5 μl ～6 μ
l である、請求項34～39のいずれか1項に記載の細胞。

41. 対場依存性であり、転写中に放散することができず、増殖葉の形成を示
さず、そしてMHC クラスII分子を発現しないことをさらに特徴とする、請求項21
～30のいずれか1項に記載の不活性ヒト神経細胞セルライン。

42. ATCC CRL-8621 として同定される不死化ヒト神経細胞セルラインの遺伝子
修飾試験等としてさらに特徴付けられる、請求項21～25のいずれか1項に記載の
不死化ヒト神経細胞セルライン。

43. 前記生物学的に活性なペプチドが、ドバミン欠陥を特徴とする神経学的
失調の治療を部数する、請求項22～27のいずれか1項に記載の不死化ヒト神経
細胞。

44. ドバミン欠陥を特徴とする神経学的失調群又は疾患をもつ哺乳動物を治
療するための医薬組成物であって、生物学的に活性なペプチドをコードする異種核酸
配列を含む後述されるペプチド活性及び/又は不活性ヒト神経細胞セルライン
を含み、ここで、上記セルラインが、(1) 上記異種核酸配列を発現し、そして
(2) 上記哺乳動物において神経転移又は神経突起伸長を誘導することができ、
そしてヒト生物学的に活性なペプチドが、ドバミン欠陥を特徴とする神経学的失調
を制御する、前記医薬組成物。

45. 前記ペプチドが酵素である、請求項44に記載の医薬組成物。

46. 前記ペプチドが疾患関連抗原である、請求項44に記載の医薬組成物。

47. 移植後に前記細胞が除去される、請求項44～46のいずれか1項に記載の医
薬組成物。

48. 前記細胞が、抗体に対して不適合性の膜により封入される、請求項44～47
のいずれか1項に記載の医薬組成物。

49. 前記不活性ヒト神経細胞セルラインがATCC CRL-8621 として同定される不
死化ヒト神経膠胎兒セルラインの遺伝子修飾等である、請求項44～48のい
ずれか1項に記載の医薬組成物。

50. 前記不活性ヒト神経細胞セルラインがATCC CRL-8621 である、請求項44に記
載の医薬組成物。

51. パーキンソン病をもつ哺乳動物を治療するための医薬組成物であって、
上記哺乳動物の脳幹神経節内に移植されるべき、生物学的に活性チロシン・ヒドロキ

シラーゼをコードする異種核酸配列を含むか腫瘍原性及び炎症性の不活性ヒト
神経細胞セルラインの治療的有用性を含み、ここで、上記セルラインが、(1) 上
記異種核酸配列を発現し、そして(2) 上記哺乳動物において神経転移又は神経
突起伸長を誘導することができる、前記医薬組成物。

52. 前記不死化ヒト神経細胞セルラインが、ATCC CRL-8621 として同定される不
死化ヒト神経膠胎兒セルラインの遺伝子修飾等である、請求項51に記載の医
薬組成物。

53. 前記不死化ヒト神経細胞セルラインがATCC CRL-8621 である、請求項52に記
載の医薬組成物。

54. ドバミン欠陥を特徴とする神経学的失調群又は疾患をもつ哺乳動物を治
療するための医薬組成物であって、上記哺乳動物において神経転移及び/又は神
経突起伸長を誘導することができる、移植されるべき非腫瘍性及び非炎症性不
死化ヒト神経細胞セルラインの治療的有用性を含む、前記医薬組成物。

55. 前記セルラインが、ヒト胎児星状細胞由来である、請求項54に記載の医薬
組成物。

56. 前記細胞が、抗体に対して不適合性である膜により封入される、請求項54
又は55に記載の医薬組成物。

57. 前記細胞が前記主の中枢神経系内に移植される、請求項54～56のい
ずれか1項に記載の医薬組成物。

58. 前記細胞が前記主の脳幹神経節内に移植される、請求項57に記載の医
薬組成物。

59. 前記細胞が前記主の脳幹神経節内に移植される、請求項57に記載の医
薬組成物。

60. 前記細胞が前記主の側室に移植される、請求項59に記載の医
薬組成物。

61. 前記不死化ヒト神経細胞セルラインが、足場依存性であり、転写大中で成
長することができず、増殖葉の形成を示さず、そしてMHC クラスII分子を発現し
ないことをさらに特徴とする、請求項41～60のいずれか1項に記載の医薬組成物

62. 前記不死化ヒト神経由来セルラインが、ATCC 8621 として同定される不死化ヒト神経由来胎児セルラインに由来する、請求項54-61のいずれか1項に記載の医薬組成物。

63. 呼吸器においてバーキンソン病を治療するための医薬組成物であって、上記哺乳動物の脳幹神経細胞内に移植されるべき 10^4 ~ 10^5 細胞密度をもつ不死化ヒト神経膠芽細胞カルラインの懸濁液の治療的有用性を含み、ここで、上記神経膠細胞が、上記医薬組成物において非腫瘍原性、非炎症性であり、そして上記哺乳動物において神経転移及びノンノン神経突触伸長を誘導することができる、前記医薬組成物。

64. 前記不死化ヒト神経由来セルラインが、足場依存性であり、載癌細胞で成長することができず、増殖抑制の形成を示さず、そしてMIL クラスII分子を発現しないことをさらに特徴とする、請求項63に記載の医薬組成物。

65. 前記不死化ヒト神経由来セルラインが、ATCC 8621 として同定される不死化ヒト神経由来胎児セルラインに由来する、請求項64に記載の医薬組成物。

66. 前記宿主が、前記細胞の移植後に免疫抑制療法を要しない、請求項63-65のいずれか1項に記載の医薬組成物。

67. 哺乳動物の神経系における病変により引き起こされるドーパミン欠陥を特徴とする神経学的失調の治療用組成物であって、街が上記医薬組成物の移植系内に置かせし、そして上記式を通して、非腫瘍原性、非炎症性かつ不死化されたヒト神経膠芽細胞カルラインの懸濁液の治療的有用性が、上記移植系内に注入されることを行はとして、ここで、上記ヒルラインが、上記哺乳動物において神経転移及び神経多走行能を有することができる、前記医薬組成物。

68. 前記不死化ヒト神経由来セルラインが、足場依存性であり、載癌細胞で成長することができず、増殖抑制の形成を示さず、そしてMIL クラスII分子を発現しないことをさらに特徴とする、請求項67に記載の医薬組成物。

69. 前記不死化ヒト神経由来セルラインが、ATCC 8621 として同定される不死化ヒト神経由来胎児セルラインに由来する、請求項67又は68に記載の医薬組成物。

70. 前記不死化ヒト神経膠セルラインがATCC CRL 8621 由来である、請求項65に記載の医薬組成物。

71. 前記不死化ヒト神経膠セルラインがATCC CRL 8621 由来である、請求項65に記載の医薬組成物。

72. 前記不死化ヒト神経膠セルラインがATCC CRL 8621 由来である、請求項69に記載の医薬組成物。

73. 前記病変が前記中枢神経系の領域に制限され、そして前記細胞が上記領域内に注射される、請求項57に記載の医薬組成物。

74. 前記細胞が輸注ポンプを用いて注射される、請求項67に記載の医薬組成物。